

Elektrophorese von Enzymen auf Acetylcellulose-Streifen

Von

J. METHFESSEL

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Martin-Luther-Universität Halle/Saale (Direktor: Prof. Dr. H. Hanson)

(Der Schriftleitung zugegangen am 30. September 1963)

In vergleichenden Versuchen an Amylase und β -Glucuronidase wird gezeigt, daß bei der Elektrophorese dieser Enzyme mit Acetylcellulose als Träger weit höhere Enzymaktivitäten erhalten bleiben als bei Papierelektrophorese.

Comparative studies on amylase and β -glucuronidase show, that in the electrophoresis of these enzymes much higher enzymic activities are preserved with acetyl-cellulose than with paper as the carrier.

Die Trägerelektrophorese von Enzymen ist heute eine viel angewandte Methodik zur Reindarstellung und Analyse dieser Wirkstoffe und neuerdings auch zur Differenzierung von Isoenzymen. Die Papierelektrophorese als das am wenigsten aufwendige Verfahren dieser Art ist jedoch mit z. T. ganz erheblichen *Einbußen an Enzymaktivität* verbunden (1—3). Diese Verluste sind neben Hitze-Inaktivierung unter anderem durch Kontakt mit Inhaltsstoffen des Papiers und durch Adsorption am Papier bedingt. Deshalb werden für enzymologische Untersuchungen als Trägermasse vielfach Schichten von Agar-Gel (4) oder Stärke-Gel (5) oder auch von synthetischen Polymerisationsprodukten bevorzugt, wobei gute Trennschärfe erreicht wird und die Enzymaktivität weitgehend erhalten bleibt. Kürzlich berichteten DOSE und KRAUSE (6) über die besonderen Vorteile von „Sephadex“-Gel als Träger; diese Substanz ist in großer Reinheit erhältlich und gestattet es, alle elektrophoretisch behandelten Stoffe quantitativ zu eluieren. Mit Rücksicht auf den größeren Aufwand, den die Gel-Elektrophorese jeglicher Art immerhin erfordert, halten wir es für angebracht, die guten Erfahrungen mitzuteilen, die wir bei der Elektrophorese von Enzymen mit *Acetylcellulose-Streifen* als Träger gemacht haben. Die hier mitgeteilten Versuche beschränken sich auf quantitative Untersuchungen über das Verhalten der Enzymaktivität von Amylase und β -Glucuronidase bei Elektrophorese auf Acetylcellulose („Celluloseacetat“) im Vergleich zur Papierelektrophorese.

Methodik

Amylase

a) Enzympräparat

Wir benutzten ein gereinigtes Trockenpräparat aus Malz, das überwiegend β -Amylase, zum kleineren Teil α -Amylase enthielt. Wir bereiteten daraus eine etwa 10proz. Lösung in 0,9proz. NaCl-Lösung, die 0,005 M in bezug auf CaCl_2 war; sie wurde durch Zentrifugieren geklärt.

b) Bebrütungsansätze

Die Zusammensetzung des Enzym-Substrat-Gemisches war folgende:

- 20 μl Amylaselösung
- 4 ml 0,2 M Acetatpuffer, pH = 5,7
- 4 ml 2proz. Lösung von löslicher Stärke nach ZULKOWSKI in Acetatpuffer.

Das Gemisch wurde 20 Min. bei 37° inkubiert. In den Experimenten mit auf Träger aufgetragener Amylase wurde das Enzym zunächst 2 Stdn. mit dem Puffer (Volumenkorrektur bei feuchten Streifen!) unter mehrfachem Rühren des Ansatzes eluiert und dann mit der Stärkelösung inkubiert. Zu jeder Versuchsreihe wurde ein Kontrollansatz mit hitzedenaturiertem Enzym hergestellt.

c) Auswertung

Wir bedienten uns dazu der photometrischen Methode in Anlehnung an die Angaben von NOELTING und BERNFELD (7): 2 ml des filtrierten Reaktionsgemisches wurden zu 2 ml 1proz. 3,5-Dinitrosalicylsäurelösung in ein 25 ml-Meßkölbchen gegeben, und dieses wurde 4 Min. in ein kochendes Wasserbad getaucht, dann rasch im Eisbad abgekühlt und mit Wasser zur Marke aufgefüllt. Photometrie der Rotbraunfärbung der Lösung im Pulfrich-Photometer (Grünfilter S 35, 1 cm-Küvette).

β -Glucuronidase

a) Enzympräparat

Wir gewannen ein hochwirksames Glucuronidasepräparat aus Rindermilz nach FISHMAN (8); es enthielt pro ml 85,0 mg Protein, nach WEICHSELBAUM (9) bestimmt.

b) Bebrütungsansätze

Zusammensetzung:

- 50 μl Glucuronidaselösung (bzw. auf Trägerstreifen aufgetragenes Enzym)
- 4 ml 0,1 M Acetatpuffer; pH = 5,0
- 4 ml 0,025 M L-Menthyl- β -D-glucuronid, das biosynthetisch aus Kaninchenharn nach den Angaben von QUICK (10) gewonnen wurde.

Das Gemisch wurde 12 Stdn. bei 37° inkubiert.

c) Auswertung

Die Substrathydrolyse wurde durch photometrische Bestimmung der freigesetzten Glucuronsäure verfolgt. Wir wählten dazu die

Tab. 1. Amylase-Aktivität vor und nach 7½- und 15stdg. Elektrophorese auf Papier bzw. Acetylcellulose; (110 V; 20° bzw. 2°).

Ansatz	Enzym- lösung ohne	Nach Auftragen		Nach Elektrophorese							
		Papier	Acetyl- cellulose		7½ Stdn.	Acetylcellulose		15 Stdn.		Acetylcellulose	
Träger					Papier			Papier			
Temp. (° C)	20	20	20	20	2	20	2	20	2	20	2
Freigesetzte Maltose (mg)	2,646	1,610	2,273	0,648	1,447	1,358	1,644	0,166	0,282	0,201	0,445
Aktivität (%)	100	60,8	85,9	24,5	54,7	51,3	62,1	6,3	10,6	7,6	16,8

Formazan-Methode (Triphenyltetrazoliumchlorid als Reagens) und folgten dabei dem Vorgehen von FAIRBRIDGE und Mitarbeitern (11). 3 ml/ des Bebrütungsansatzes wurden mit 1 ml/ 20proz. Trichloressigsäure enteiweißt. 3 ml/ des Filtrats wurden dann zum Farbreaktionsgemisch gegeben, dessen Rotfärbung mit dem HAVEMANN-Kolorimeter „MGF“ gemessen wurde. Bei der Bestimmung der elektrophoretisch behandelten Enzymproben wurde 1 cm Schichtdicke gewählt, während die sonstigen Ansätze in der 0,2 cm-Küvette gemessen wurden.

Trägerelektrophorese

Die Elektrophoreseversuche wurden an einer selbst gebauten Apparatur im Prinzip nach den Angaben von GRASSMANN und HANNIG (12) durchgeführt. Als Träger verwendeten wir vergleichsweise Filterpapier Nr. 2043a Mgl der Fa. Schleicher & Schüll und Acetylcellulose-Streifen in Form der sog. Membranfolien der Membranfilter-Gesellschaft. In einem Teil der Versuche wurde auch das Papier „Elphor“ des VEB Spezialfilterpapierfabrik, verwendet. Auf die puffergetränkten Streifen wurden 20 bzw. 50 µl Enzymlösung aufgetragen und über 7½ und 15 Stdn. eine Gleichspannung von 110 bzw. 165 V angelegt. Die Versuche wurden ohne unmittelbare Kühlung des Streifens, jedoch bei verschiedener Raumtemperatur (20°, 4°, 2°) durchgeführt. — Nach beendeter Elektrophorese wurden für die Bebrütungsansätze nach 7½stdg. Elektrophorese 10 cm lange Rumpfstücke und nach 15stdg. Elektrophorese 14 cm lange Mittelabschnitte des Streifens verwendet, die in jedem Fall die während der Elektrophorese durchlaufende Wegstrecke des Enzyms umfaßten. Die noch feuchten Streifen wurden fein zerschnitten und zum Puffer bzw. zum Substrat-Puffer-Gemisch gegeben.

Um die allein durch die Gegenwart von Papier bzw. Acetylcellulose eintretenden Aktivitätsverluste von den durch den Elektrophoresevorgang selbst bedingten abgrenzen zu können, wurden vergleichende Versuche angestellt, in denen das Enzym auf die puffergetränkten Streifen nur aufgetragen, dann in der angegebenen Weise wieder eluiert wurde.

Ergebnisse

Amylase

Die Tabelle 1 ermöglicht den Vergleich der verbleibenden Restaktivitäten auf Papier einerseits und Acetylcellulose andererseits. Mit dem letzteren wird

durchweg eine höhere, teilweise bis doppelt so große Enzymaktivität wiedergefunden.

Wir prüften weiterhin, in welchem Maße bereits die vielstündige Verweildauer der Amylase auf dem feuchten Streifen ohne Einwirkung des elektrischen Stromes partielle Inaktivierung herbeiführt. Diese Versuche wurden teilweise unter Calciumzusatz durchgeführt, der, wie aus Tabelle 2 hervorgeht, vor allem bei Aufbe-

Tab. 2

Amylase-Aktivität bei Aufbewahren der mit Enzym versehenen Streifen in der feuchten Kammer bei 20° und bei 2° (Werte in mg freigesetzte Maltose)

Träger	Sofort inkubiert		Nach 7½stdg. Aufbewahrung			
	ohne Ca ¹⁾		20° C		2° C	
	ohne Ca ¹⁾	mit Ca	ohne Ca	mit Ca	ohne Ca	mit Ca
Papier	1,619	1,625	1,221	1,366	1,587	1,628
Acetylcellulose	2,294	2,319	1,931	2,298	2,314	2,318

¹⁾ Der Calciumzusatz ($6,67 \cdot 10^{-3} m$ CaCl₂) bezieht sich auf den zum Anfeuchten der Streifen benutzten Acetatpuffer.

wahrung der amylasehaltigen Streifen bei Zimmertemperatur eine stabilisierende Wirkung entfaltet. Auch hier zeitigte Acetylcellulose wiederum weit bessere Enzymausbauten als Papier. — Übrigens war Calcium, dem Elektrophoresepuffer zugesetzt, nicht in der Lage, die in Tabelle 1 aufgezeigten bei der Elektrophorese eintretenden Aktivitätsverluste auch nur geringfügig herabzusetzen. Dagegen steigerte Zusatz von Äthylendiamintetraacetat (EDTA) in allen Versuchen die Amylaseaktivität, wobei der Komplexbildner teils zur Inkubationsflüssigkeit, teils zum Elektrophoresepuffer gegeben wurde, wie Tabelle 3 zeigt. — Mit Acetylcellulose wurden prinzipiell die gleichen Befunde wie mit dem mit Enzym versehenen Papier erhoben, nur daß eben bei dem ersteren durchweg weit höhere Aktivitäts-

Tab. 3. Einfluß von Äthylendiamintetraacetat auf die Amylase-Aktivität vor und nach Trägerelektrophorese (Werte in mg freigesetzte Maltose bzw. % Aktivität)

Träger	Enzymlösung				Nach 7½stdg. Elektrophorese			
	ohne Träger		auf Träger		Elektrophoresepuffer			
	Inkubation ohne EDTA	mit ¹⁾ EDTA	Inkubation ohne EDTA	mit EDTA	ohne EDTA	mit EDTA	ohne EDTA	mit EDTA
Papier	2,788	2,834	1,706	1,931	0,640	0,853	0,935	1,087
	100	(100)	61,2	(68,1)	23,0	(30,1)	33,5	(38,4)
Acetylcellulose	—	—	2,334	2,497	1,390	1,420	1,400	1,974
			83,7	(88,1)	50,0	(50,1)	50,2	(69,6)

¹⁾ $6,67 \cdot 10^{-3} m$ EDTA.

werte resultierten. Diese betrugen in den Elektrophoreseversuchen etwa 150–200% der enzymatischen Aktivität, die bei Verwendung von Papier als Träger gemessen wurde.

β -Glucuronidase

Auch bei diesem Enzym bewährte sich Acetylcellulose als Träger weit besser als Papier, wie Tabelle 4 zeigt. In diese Versuche wurde auch das Papier „Elphor“ mit einbezogen; es hatte sich in vergleichenden Untersuchungen über den Einfluß der Papiersorte auf die Aktivität verschiedener Enzyme unter sieben Papieren neben 2043a als besonders günstig erwiesen.

Tab. 4

β -Glucuronidase-Aktivität vor und nach Elektrophorese auf Papier bzw. Acetylcellulose (15 Std.; 165 V; 4°)

Träger	Ohne Träger		Mit Träger		Nach Elektrophorese	
	Glucuron-säure	Aktivität	Glucuron-säure	Aktivität	Glucuron-säure	Aktivität
	mg	%	mg	%	mg	%
Papier 2043a	0,490	100	0,330	67,4	0,120	24,5
Papier „Elphor“	0,490	100	0,275	56,1	0,100	20,4
Acetylcellulose	0,440	100	0,425	96,1	0,355	80,7

Diskussion

Aus allen Versuchen geht hervor, daß Acetylcellulose selbst bestem Filterpapier hinsichtlich der Erhaltung der Enzymaktivität überlegen ist. Dieser günstige Effekt wird in den Elektrophorese-Experimenten besonders deutlich. Da hierbei das Enzym mit dem Träger in besonders innigen Kontakt kommt und schließlich auf größere Oberfläche ausgebreitet wird als beim bloßen Auftragen auf den Streifen, müssen sich bei diesem Verfahren Adsorptionerscheinungen zwangsläufig in erhöhtem Maße äußern. Von Acetylcellulose

aber ist bekannt, daß sie Proteine nicht oder nur in sehr geringem Umfang adsorbiert (19–21). Dies dürfte auch der hauptsächliche Grund für die höhere Enzymaktivität bei Verwendung von Acetylcellulose in der Trägerelektrophorese sein. Die Enzymadsorption wird durch die Gegenwart polyvalenter Anionen herabgesetzt (13). Der dementsprechend von MICHL (14) vorgeschlagene Zusatz eines Proteins zum Puffer hat sich auch in unserem Laboratorium z. B. bei der Papierelektrophorese von Hyaluronidase bewährt (15). Er ist beim Arbeiten mit Enzymen jedenfalls dem von anderer Seite zwecks Herabsetzung der Proteinadsorption empfohlenen Imprägnieren des Papiers mit einem Detergens (16, 17) vorzuziehen. Aus dem Gesagten läßt sich ableiten, daß die durch Adsorption bedingten Enzymverluste um so größer sein werden, je reiner das der Papierelektrophorese unterworfenene Enzympräparat ist. Wir haben das an verschiedenen kristallisierten Enzymen demonstrieren können (18). Wie eingangs angedeutet, ist auch eine Schädigung von Enzymen durch Inhaltsstoffe des Papiers in Betracht zu ziehen. Nach unseren Untersuchungen (3) kommt hierbei dem Schwermetallgehalt (Fe!) — auch der in der Papierchromatographie und -elektrophorese bewährten Papiersorten — besondere Bedeutung zu, vor allem bei der Elektrophorese SH-abhängiger Enzyme. Acetylcellulose ist aber in größerer chemischer Reinheit erhältlich als Papier. — Daß auch bei der Trägerelektrophorese mit Acetylcellulose Aktivitätsverluste von Enzymen auftreten, ist natürlich auf Denaturierung zurückzuführen, die ohne zusätzliche Kühlung am Träger kaum völlig auszuschließen ist. Immerhin scheint uns das genannte Verfahren empfehlenswert, wenn es darauf ankommt, ohne großen Aufwand Enzyme elektrophoretisch zu behandeln. Im Hinblick auf den relativ hohen Preis derartiger Acetylcellulosefolien ist es von Vorteil, daß ihre Wiederverwendung z. B. nach der Elektrophorese von Serumproteinen möglich ist (22).

Literatur

1. METHFESSEL, J., *Naturwissenschaften* 44, 329 (1957). — 2. METHFESSEL, J., IV. Internat. Kongreß für Biochemie, Zusammenfassungen 4–118, Wien (1958). — 3. METHFESSEL, J., *Wiss. Z. Martin-Luther-Univ. Halle-Wittenberg, math.-naturwiss. R.* XII/2, 123 (1963). — 4. GORDON, A. H., B. KEIL und K. SEBESTA, *Nature (London)* 164, 498 (1949). — 5. SMITHIES, O., *Biochem. J.* 61, 629 (1955). — 6. DOSE, K. und G. KRAUSE, *Naturwissenschaften* 49, 349 (1962). — 7. NOELTING, G. und P. BERNFELD, *Helv. chim. Acta* 31, 286 (1948). — 8. FISHMAN, W. H., *J. biol. Chemistry* 127, 367 (1939). — 9. WEICHELBAUM, T. E., *Amer. J. Clin. Path.* 10, 40 (1946). — 10. QUICK, A. J., *J. biol. Chemistry* 61, 667 (1924). — 11. FAIRBRIDGE, R. A., K. J. WILLIS und R. G. BOOTH, *Biochem. J.* 49, 423 (1951). — 12. GRASSMANN,

W. und K. HANNIG, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 290, 1 (1952). — 13. COLOWICK, S. P. in COLOWICK-KAPLAN, *Methods in Enzymology* I, S. 90, Acad. Press Inc., New York (1955). — 14. MICHL, H., *Mh. Chem.* 85, 1251 (1954). — 15. NILIUS, R., *Dissertation, Med. Fak. Halle* (1961). — 16. TISELIUS, A. und P. FLODIN, *Advances Protein Chemistry* VIII, S. 461, Acad. Press. Inc., New York (1956). — 17. MONTY, K. J., M. MORRISON, E. ALLING und E. STOTZ, *J. biol. Chemistry* 220, 295 (1956). — 18. METHFESSEL, J., *Habilitationsschrift Halle* (1960). — 19. KOHN, J., *Nature (London)* 181, 839 (1958). — 20. PIEPER, J., *Zschr. exper. Med.* 131, 359 (1959). — 21. WIELAND, TH., G. PFLEIDERER, J. HAUPT und W. WÖRNER, *Biochem. Z.* 332, 1 (1959). — 22. JACOBS, S., *Nature (London)* 183, 1326 (1959).

Doz. Dr. med. habil. Dr. rer. nat. J. Methfessel
Halle/Saale, Hollystr. 1